

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
窪 木 拓 男 印	研究総括ならびに指導
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	インプラント再生補綴学分野	身分	大学院生	氏名	古 味 佳 子
論 文 題 名 マウス長管骨創傷治癒過程における宿主骨髄由来間葉系幹細胞がもたらす免疫寛容性とそのメカニズム					
論文内容の要旨（2000字程度）					
<p><b>【背景】</b></p> <p>骨髄由来間葉系幹細胞は、自己複製能や多分化能に加えて、免疫調節能を持つ細胞群である。これらの機能を応用した組織再生療法や全身性幹細胞移植療法の実用化が広く検討されているものの、移植コストや幹細胞の性質の維持等、解決すべき問題が多数存在するのが現状である。これらの幹細胞移植療法の問題点を改善する試みとして、宿主免疫応答の調節や移植幹細胞の質の向上の検討が報告されている。さらには、組織損傷部位に誘導・集積する事が報告されている宿主未分化間葉系幹細胞を応用することで、組織再生や疾患の改善に繋げようとする試みも始まりつつある。しかしながら、炎症性サイトカインが豊富な組織創傷治癒部位に集積した宿主幹細胞が、損傷組織中でどのような影響を受け、その結果、幹細胞の多分化能や免疫調節能が組織再生にどのように寄与するのかについては十分な理解が得られていない。そこで本研究では、創傷治癒部位における宿主間葉系幹細胞の集積、炎症性サイトカインが集積幹細胞に与える影響、宿主間葉系幹細胞が免疫寛容性に寄与するメカニズムを検討した。</p> <p><b>【材料および方法】</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>マウス創傷治癒モデル</b>: 全身麻酔下でC57BL6/Jマウスの大腿骨を露出させた後、直径1.0 mmのラウンドバーを用いて、大腿骨皮質骨腹側を穿孔した。穿孔後1, 3, 5, 7日に屠殺し、以降の実験に使用した。なお、本研究は、岡山大学動物実験委員会承認（OKU-2013397）のもと実地した。</li> <li>2. <b>組織学的検討</b>: 創傷治癒モデルの大腿骨を凍結包埋し、川本法に準じて切片を作製し、HE染色、免疫組織化学染色にて創傷治癒過程におけるCD146陽性細胞ならびに炎症性サイトカイン（TNF-<math>\alpha</math>）の組織学的検討を行った。</li> <li>3. <b>細胞表面抗原解析およびアポトーシス検出</b>: 創傷治癒モデル大腿骨骨髄の間葉系幹細胞表面抗原（CD146, CD90, Sca-1）およびT細胞アポトーシスをフローサイトメトリーにて解析した。</li> <li>4. <b>炎症性サイトカインの遺伝子発現解析</b>: 創傷治癒過程の炎症性サイトカイン（Il-1b, Il-6, Ifn-g, Tnf-a）の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRを用いて検討した。</li> <li>5. <b>細胞の分離・培養</b>: C57BL6/Jマウス大腿骨からマウス骨髄由来間質細胞（mBMSCs）をFriedensteinらの方法によって単離、培養し以降の実験に使用した。</li> <li>6. <b>In vitroにおけるTNF-<math>\alpha</math>の細胞表面抗原発現に与える影響</b>: TNF-<math>\alpha</math>（0-20 ng/mL）のmBMSCsの細胞表面抗原（CD146）発現に与える影響をフローサイトメトリーにて検討した。</li> </ol>					

7. *In vitro* における TNF- $\alpha$  の細胞増殖能および走化性に与える影響: TNF- $\alpha$  の mBMSCs の細胞増殖能に与える影響を MTS 試験にて、走化性に与える影響をスクラッチアッセイ法にてそれぞれ検討した。

8. *In vitro* における TNF- $\alpha$  の免疫抑制能に与える影響: TNF- $\alpha$  の mBMSCs の免疫抑制能に与える影響を検討するために、FasL の発現をフローサイトメトリーならびに免疫細胞化学染色にて解析した。さらに、T 細胞と共培養し、T 細胞のアポトーシス誘導ならびに制御性 T 細胞の分化誘導に与える影響をフローサイトメトリーにて検討した。

9. 統計解析: 統計学的有意性は、one-way ANOVA, unpaired-*t* 検定にて評価した。

## 【結果と考察】

### 1. 創傷部位における CD146 陽性細胞数の増加

マウス大腿骨穿孔後の大腿骨治癒過程における CD146 陽性細胞の集積, CD146, CD90, Sca-1 陽性かつ, Lineage 陰性細胞の数は, 穿孔後 1 日をピークに増加し, その後減少していたことが明らかとなった。

### 2. 創傷大腿骨の mBMSCs における幹細胞性の検討

創傷治癒過程の各タイムポイントから単離・培養した mBMSCs の CD146 の発現は有意な差は認められず, 細胞走化性は穿孔後 3 日をピークに移動細胞数が有意に上昇し, 穿孔後 7 日では, 穿孔前と同程度まで減少する事が明らかとなった。

### 3. 創傷大腿骨の骨髄細胞における炎症性サイトカインの発現解析

炎症性サイトカイン (Il-1b, Il-6, Ifn-g, Tnf-a) の遺伝子発現は穿孔後 1 日目に有意に上昇し, その後減少していることが明らかとなった。同様に, TNF- $\alpha$  の免疫組織化学染色においても穿孔後 1 日で炎症性サイトカインの増加している像が観察された。

### 4. 非創傷大腿骨から採取, 培養した mBMSCs の幹細胞性に及ぼす TNF- $\alpha$ 刺激の影響

mBMSCs を TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) にて 24 時間刺激すると CD146 の発現が上昇した。また, TNF- $\alpha$  刺激した mBMSCs は無刺激と比較して, 有意に細胞増殖が抑制されており, 細胞走化性が有意に高いことが明らかとなった。さらに, TNF- $\alpha$  刺激群は無刺激群と比較して FasL の発現上昇が認められ, TNF- $\alpha$  刺激した mBMSCs と T 細胞を共培養すると T 細胞アポトーシスならびに制御性 T 細胞の分化誘導が促進される事が明らかとなった。

### 5. 創傷大腿骨骨髄における FasL 陽性 mBMSCs 数と T 細胞アポトーシスの変化

創傷大腿骨骨髄における FasL 陽性幹細胞は穿孔後 1 日目をピークとして有意に増加し, それに伴ってアポトーシス T 細胞の増加, T 細胞数が減少することが明らかとなった。

創傷治癒部位における炎症性サイトカインは組織損傷後に増加し, 同時に宿主間葉系幹細胞が集積する事が確認された。*In vitro* における TNF- $\alpha$  が, mBMSCs の増殖能を抑制し, 走化性を促進することから, 炎症性サイトカインによって損傷部位周囲の宿主間葉系幹細胞の集積が誘導された可能性が考えられる。そして, FasL の発現を促進することで宿主 T 細胞のアポトーシスを誘導し, 炎症を調節している可能性が示唆された。しかしながら, 創傷治癒部位での抗炎症作用がどのように組織再生の効率化につながるか, 集積間葉系幹細胞が T 細胞のアポトーシスを誘導した後, どのような運命をたどるのか等, 今後の十分な検討が必要であると考えられる。

## 【結論】

マウス大腿骨創傷治癒過程において, 穿孔 1 日後に宿主間葉系幹細胞が集積することが確認された。炎症性サイトカインのひとつである TNF- $\alpha$  は, *in vitro* において mBMSCs の CD146 と FasL の発現を上昇させることが明らかとなった。また, 創傷治癒過程においては穿孔 1 日後に FasL 陽性細胞数の増加を認め, 3 日後に T 細胞アポトーシスの誘導が促進されたことから, 集積間葉系幹細胞による創傷治癒部位の免疫調節作用発現の可能性が示唆された。